

Jihočeská universita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



**Výskyt klíšťat a jimi přenášených patogenů v městském
parku v Českých Budějovicích**

Bakalářská práce

Zuzana Vavrušková

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Školitel specialista: Mgr. Václav Hönig

České Budějovice

Vavrušková Z., 2010: Výskyt klíšťat a jimi přenášených patogenů v městském parku v Českých Budějovicích [Occurrence of ticks and tick-borne pathogens in a urban park area of Ceske Budejovice, Bc Thesis, in Czech].

Annotation: A total of 369 *Ixodes ricinus* ticks (330 nymphs, 39 adults) were collected in the urban park area Stromovka in Ceske Budejovice (Czech Republic) and tested for the presence of Lyme disease spirochets *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Práce byla finančně podpořena granty: Výzkumný záměr PřF JU 6007665801, Výzkumné centrum 39-LC06009.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně jen s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou universitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2010

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala hlavně svému školiteli-specialistovi Mgr. Václavu Hönigovi za nezměrnou trpělivost, rady a odborné vedení v průběhu celé práce. Další poděkování patří mému školiteli a vedoucímu laboratoře Molekulární biologie vektorů a patogenů Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc. za možnost pracovat v této laboratoři. V neposlední řadě děkuji všem Mgr. Jánu Štěrbovi, kolegům a studentům v laboratoři za příjemné pracovní prostředí a pomoc při řešení problémů. Dále mé poděkování patří Bc. Patriku Kilianovi za zajištění vzorků. Mé poděkování patří mojí matce za trpělivost a podporu nejen při studiu

Obsah

Obsah.....	1
Seznam zkratk.....	2
1. Úvod.....	3
2. Hlavní cíle práce.....	4
3. Literární přehled.....	5
3.1. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	5
3.1.1 Taxonomické zařazení.....	5
3.1.2 Morfologie.....	5
3.1.3 Genom.....	6
3.1.4 Variabilita v rámci komplexu.....	7
3.1.5 Lymeská borelióza - historie, příznaky, léčba.....	8
3.2. Klíšťata jako vektorů <i>B. burgdorferi</i>	9
3.2.1 Taxonomické zařazení.....	9
3.2.2 Morfologie.....	10
3.2.3 Metody detekce a identifikace genomových druhů.....	11
3.3. Cirkulace <i>B. burgdorferi</i> v přírodě.....	12
3.3.1 Hostitelé.....	12
3.3.2 <i>B. burgdorferi</i> v urbánních a periurbánních oblastech.....	13
4. Materiál a metody.....	14
4.1 Sběr vzorků.....	14
4.2 Detekce <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	14
4.3 Metody identifikace genomových druhů <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	16
5. Výsledky.....	19
5.1 Populační aktivita <i>I. ricinus</i>	19
5.2 Prevalence <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	20
5.3 Identifikace genomových druhů <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	22
6. Diskuze.....	27
7. Závěr.....	30
Seznam použité literatury:.....	30

Seznam zkratek

LB - Lymeská borelióza

s.l. - sensu lato

s.s. - sensu stricto

B. burgdorferi, *B.b.* - *Borrelia burgdorferi*

I. ricinus - *Ixodes ricinus*

Osp - protein vnější membrány (outer surface protein)

VlsE - povrchový lipoprotein borélií (variabilitou zajišťuje únik před imunitou hostitele)

BSK - Barbour-Stoenner-Kelly medium

pb - párů bází

Fla - flagelin

TROSPA - receptor klíšťat pro OspA borélií (tick receptor for OspA)

Dbp - decorin vázající protein (‘decorin binding protein’)

PCR - polymerázová řetězová reakce (‘polymerase chain reaction’)

RFLP - délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (‘restriction fragment length polymorphism’)

RLB - ‘reverse line blotting’

1. Úvod

Klíšťata jsou významnými vektory různých virových, bakteriálních i protozoárních patogenů vyskytujících se v přírodních ohniscích. Mezi nejznámější patří lymeská borelióza a klíšťová encefalitida. Výskyt lymeské boreliózy je dokumentován přibližně od 70. let, ale její původce byl poprvé izolován až v roce 1982 Dr. Willy Burgdorferem, podle kterého je také spirochéta nazvána *Borrelia burgdorferi*. Borélie nejsou jedinými zástupci spirochét, které způsobují onemocnění u lidí, dalšími jsou například původci syfilis nebo leptospirózy.

Mimo tato dvě hlavní onemocnění mohou klíšťata také přenášet například původce lidské granulocytární anaplasmózy (*Anaplasma phagocytophilum*), tularemie (*Franciscella tularensis*), rickettsiální skvrnitě horečky (*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*), Q horečky (*Coxiella burnetii*), texaské horečky skotu (*Babesia bigemina*).

Kromě obvyklých biotopů klíšťat, jako jsou listnaté a smíšené lesy se klíšťata vyskytují také v urbánních oblastech, kde jim vhodné podmínky pro život poskytují například městské parky, zahrady, hřbitovy. Vzhledem k hojnému využití těchto oblastí člověkem je výskyt klíšťat a jimi přenášených patogenů také epidemiologicky velmi důležité téma.

2. Hlavní cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma lymeská borelióza, mechanismy cirkulace.
2. Zjištění prevalence a zastoupení genomových druhů *B. burgdorferi* s.l. v městském lesoparku Stromovka v Českých Budějovicích.
3. Identifikace genomových druhů *B. burgdorferi* s.l. pomocí metod - 'reverse line blotting' (RLB) a délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP).

3. Literární přehled

3.1. *Borrelia burgdorferi* sensu lato

3.1.1 Taxonomické zařazení

Spirochéta *Borrelia burgdorferi* s.l. je taxonomicky zařazena do říše *Eubacteria*, kmene *Spirochaetes*, třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales*, čeledě *Spirochaetaceae*, rodu *Borrelia* (Bergey's manual 2004).

3.1.2 Morfologie

Bakterie kmene *Spirochaetes* jako jsou např. *Treponema pallidum* (původce syfilis), *Leptospira interrogans* (původce leptospirózy) či *Borrelia* sp. (původci návratných horeček a lymeské boreliózy) mají variabilní morfologii buňky, která obecně zahrnuje vlnité buňky s bičíky uzavřenými mezi vnější a vnitřní membránou buňky (Tilly et al. 2008). Buňka *Borrelia burgdorferi* je přibližně 10-20 μm dlouhá a 0,33 μm široká. Za určitých podmínek může produkovat extracelulární vezikuly, které obsahují DNA a několik proteinů spojených s vnější membránou (jako je OspA, OspB) (Charon et al. 2009).

Tyto bakterie mají protoplasmatický válec, který zahrnuje plazmatickou membránu a peptidoglykanovou vrstvu, protoplasmatický válec je kryt vnější membránou. Oblast mezi plazmatickou a vnější membránou představuje periplazmatický prostor, kde se nacházejí bičíky (Charon et al. 2009). Periplazmatický bičíkový motor je lokalizován na obou koncích buňky. Rotace bičíků způsobuje vlnivé pohyby celé buňky a ta se pak efektivně provrtává tkáněmi a diseminuje do orgánů. Bičíkový motor je poháněn elektrochemickým potenciálem iontů procházejících přes cytoplasmatickou membránu (Liu et al. 2009). Periplazmatických bičíků je 7-11 ve svazku a skládají se z bazální části, háčku a vláken, která obsahují dva typy proteinů, větší flagelin FlaB a menší flagelin FlaA (Sal et al. 2008).

B.b. je mikroaerofilní bakterie (Fraser et al. 1997), která roste pomalu a je náročná na složení media. Kultivuje se v různých modifikacích media BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) (Elias et al. 1998) při 23 °C až 37 °C (Revel et al. 2002, Rudenko et al. 2005, Postic et al. 2007).

3.1.3 Genom

Genom různých druhů borélií má některé společné znaky jako např.: lineární chromozom a velký počet kruhových i lineárních plazmidů. Lineární struktura chromozomu a plazmidů u bakterií neobvyklá, proto je charakteristická pro rod *Borrelia* (Tilly et al. 2008). Velikost genomu *B. burgdorferi* dosahuje přibližně $1,5 \times 10^6$ pb. Obsahuje celkem 1780 genů (Fraser et al. 1997, Steere et al. 2004, Hovius et al. 2007). Celkem 93 % genomu *B.b.* reprezentuje kódující sekvence, z toho 59 % má přiřazenu biologickou funkci. Kódující sekvence na plazmidech zaujímají pouze 71 %, což ukazuje, že intergenové oblasti jsou na plazmidech delší než na chromozomu. V intergenových oblastech plazmidů borélií jsou krátké repetitivní sekvence nukleotidů, důležité například pro vytvoření sekundární struktury RNA. Intergenová oblast rRNA operonu, mezi tandemovými kopiemi genů pro 23S a 5S rRNA, se využívá k rozlišení genomových druhů komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Fraser et al. 1997, Delias 2009, Margos et al. 2009).

Velká část genomu kóduje membránové lipoproteiny (Steere et al. 2004, Hovius et al. 2007), které nacházíme ve vnější vrstvě cytoplazmatické membrány a v obou vrstvách membrány vnější. Povrchové lipoproteiny se často uplatňují v interakci borélií s vektory a hostiteli a jejich exprese proto bývá poměrně složitě regulována. *B. burgdorferi* si vyvinula mechanismus pro přežití jak v obratlovcích, tak v bezobratlém vektoru – regulace exprese genů je v řadě případů závislá na prostředí, ve kterém se borélie vyskytuje (Hovius et al. 2007).

Například (lipo)protein OspA je exprimován ihned po vstupu do klíštěte a při osídlení jeho střev, kde zprostředkovává adhezi ke střevu vazbou na receptorový protein TROSPA („tick receptor for OspA“); nalezeným u *I. scapularis*, předpokládá se výskyt analogických receptorů i u jiných druhů klíšťat. Geny pro OspA, B jsou mezi různými izoláty borélií v USA vysoce konzervované. Jsou kódovány na lineárním plazmidu lp54 (Neelakanta et al. 2007, Maruskova et al. 2008) V savčím hostiteli jsou exprimovány jen velmi zřídka (Battisti et al. 2008). Při sání krve nastává reciproká regulace genové exprese proteinů OspA/C. Syntéza OspA je tlumena, čímž se spirochéty uvolní ze střev, naopak syntéza OspC je aktivována, což je spojeno s migrací spirochét ze střev do slinných žláz klíštěte (Gilbert et al. 2007).

Mezi další významné povrchové proteiny *B. burgdorferi* patří povrchový protein VlsE, který umožňuje antigenní modifikaci a podílí se tím na přetrvávání infekce navzdory imunitní reakci organismu (Steere et al. 2004). Velké množství různých variant VlsE je přítomno

v hostiteli zároveň a jsou generovány rekombinací genu *vlsE* a přilehlých 15-ti *vls* tichých kazet (Lin et al. 2009).

Také proteiny Dbp A, B, kódované na dvou na sebe navazujících genových operonech, jsou povrchové lipoproteiny. Oba proteiny jsou přibližně ze 40 % identické a váží se na decorin a glykosaminoglykany v extracelulární matrix hostitelských tkání. Tyto adheziny o velikosti 20 kDa mohou být rozhodující pro virulenci *B. burgdorferi* (Shi et al. 2008). V souvislosti s adheziny byl ve slinách *I. scapularis* nalezen 15 kDa velký, sáním indukovaný protein označovaný jako Salp 15, který chrání vazbou na OspC spirochéty před protilátkou zprostředkovaným zabíjením v savčím hostiteli. Podobně je tomu u *Ixodes ricinus*, u kterého byly identifikovány homology Salp15 (Hovius et al. 2008).

3.1.4 Variabilita v rámci komplexu

Ve 20. století byla lymeská borelióza (LB) rozpoznána jako nejrozšířenější klíšťaty přenášené onemocnění severní polokoule. Dosud je známo 17 genomových druhů komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Jsou to: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*, *B. yangtze*, *B. americana*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*. Minimálně tři druhy jsou prokazatelně patogenní pro člověka: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto. V lidských vzorcích pacientů s LB byly nalezeny také: *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae* a za nepatogenní jsou stále považovány např. *B. japonica*, *B. turdae*, *B. sinica*, *B. tanukii* (Steere et al. 2004, Rudenko et al. 2009).

Podle geografického rozšíření dělíme druhy na severoamerické (*B.b.* s.s., *B. californiensis*, *B. bissettii*, *B. carolinensis*), euroasijské (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdae*, *B. sinica*) (Steere et al. 2004, Rauter a Hartung 2005, Rudenko et al. 2009, Margos et al. 2009).

V Evropě LB nejčastěji přenáší klíště *Ixodes ricinus*, v Asii *Ixodes persulcatus* a v severní Americe *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* (Smetanová et al. 2007, Margos et al. 2009)

B.b. s.s. u lidí způsobuje infekci spojenou s postižením kloubů (*arthritis*), srdce, případně dalších orgánů. *B. garinii* je spojována s neuroboreliózou a *B. afzelii* (*B. lusitaniae* v Portugalsku) (Smetanová et al. 2007) s kožními projevy (*acrodermatitis chronica atropicans*) (Hovius et al. 2007).

Mnohé studie ukázaly, že existují specifické asociace mezi druhy borélií a rezervoárovými zvířaty. Hlavními hostiteli *B. afzelii* a *B. bavariensis* (také OspA serotyp 4 *B. garinii*) jsou zejména malí hlodavci, *B. valaisiana* a *B. garinii* jsou spojovány s ptáky (Margos et al. 2009, Morán-Cadenas 2007). *B.b. s.s.* se vyskytuje jak u hlodavců, tak u ptáků (Rauter a Hartung 2005). V hostitelské specifitě hraje zřejmě významnou roli komplement hostitele. Například komplement hlodavců lyzuje spirochéty *B. garinii* a *B. valaisiana*, ale ne *B. afzelii*, kterou lyzuje naopak komplement ptačí (Kurtenbach et al. 2001).

V Evropě jsou nejvíce rozšířené *B. afzelii*, *B. garinii* a *B.b. s.s.*, méně pak *B. valaisiana* a nejméně *B. lusitaniae*. Existují i případy koinfekce dvěma a více druhy v jednom klíšťeti (Rauter a Hartung 2005). *B. valaisiana* a *B. lusitaniae* se ve větší míře vyskytují zejména v západním středomoří. Zastoupení *B.b. s.s.* v Evropě směrem k východu klesá (Hubálek a Halouzka 1997, Rauter a Hartung 2005).

3.1.5 Lymeská borelióza - historie, příznaky, léčba

Lymeská borelióza byla popsána jako infekční choroba Dr. Steerem a kolegy v roce 1977 v USA. Dr. Willy Burgdorfer následně izoloval spirochéty ze střev klíšťat sesbíraných v oblasti výskytu LB a zjistil, že injikované spirochéty způsobují u pokusných králíků symptomy, jako je *erythema migrans*. Tyto bakterie byly následně pojmenovány *Borrelia burgdorferi* (Tilly et al. 2008).

K infekci boréliemi dochází během sání infekčního klíštěte. Z místa přísátí se spirochéty šíří krevní cestou do mnoha orgánů včetně srdce, kloubů a periferní i centrální nervové soustavy (Myers et al. 2009). Klinické příznaky se liší v závislosti na věku pacienta, genomovém druhu borélie a dalších faktorech. Rozlišuje se rané a pozdní stadium onemocnění a podle manifestace se dělí na lokální a generalizovanou formu. Stádium I (rané): Trvá několik dní až týdnů po infekci. V tomto stádiu se u části pacientů objevuje *erythema migrans* v okolí místa přísátí klíštěte. Stádium II: Trvá několik týdnů až půl roku po infekci.

Může se objevovat artritida, myalgie, lymfocytom, perikarditida či postižení nervového systému: meningoradiculitida (zánět mozkových plen a kořenů nervů – tzv. Bannwarthův syndrom), meningitida, obličejová paréza, encefalitida, myelitida. Jako stádium III (pozdní, persistentní) se označuje onemocnění, které přetrvává déle než půl roku po infekci. Dlouhodobé následky mohou zahrnovat - mozkovou arteritidu, (mono-) oligoartritidu, *acrodermatitis chronica atrophicans* (Bratton et al. 2008, Nau et al. 2009, Hildenbrand et al. 2009).

Preventivní opatření vhodná k zabránění infekce LB jsou: nosit vhodný ochranný oděv, pečlivě kontrolovat kůži na výskyt klíšťat, přisáté klíště co nejdříve odstranit. Při odstraňování klíštěte je vhodné použít pinzetu a zamezit prasknutí nebo potírání klíštěte mastí apod. Po odstranění klíštěte by se měla rána desinfikovat (Nau et al. 2009). Úspěšnost přenosu borélií závisí na délce sání, minimální doba potřebná pro přenos je zřejmě kratší než 17 hodin. Nejsou žádné důkazy, že způsob odstranění přisátého klíštěte ovlivňuje pravděpodobnost přenosu borélií z klíštěte na hostitele (Kahl et al. 1998). Mezi nejvíce ohrožené skupiny obyvatel patří profesionálně exponovaní jedinci, jako jsou lesní pracovníci, lovci, lesníci, myslivci, farmáři a vojáci (Lindgren and Jaenson 2006).

Diagnostika LB se provádí z krevních vzorků sérologickým, imunoenzymatickým testem ELISA. Ten detekuje protilátky proti *B. burgdorferi* (IgG a IgM) v krvi (Buczek et al. 2009). V případě, že jsou výsledky nejasné, používá se jako konfirmační test metoda imunoblotting (také na protilátky IgG a IgM). Velmi výjimečně se detekuje boréliová DNA ve vzorcích kůže, krve nebo z mozkomíšního moku metodou PCR. PCR dosud není součástí rutinní diagnostiky boreliózy. Léčba spočívá v podávání antibiotik, jako jsou například doxycyklin, amoxicilin, penicilin (Bratton et al. 2008).

3.2. Klíšťata jako vektorů *B. burgdorferi*

3.2.1 Taxonomické zařazení

Klíšťata jsou obligátní hematofágní členovci. Jsou zařazena do podkmene klepítkatci (*Chelicerata*), třídy pavoukovci (*Arachnida*), podtřídy roztoči (*Acarina*), řádu klíšťata (*Ixodida*). Dále se dělí na tři čeledi: *Ixodidae* („tvrdá klíšťata“), *Argasidae* (klíšťáci)

a *Nuttalliellidae* (tato čeleď je reprezentována jediným druhem *Nuttalliella namaqua*) (Horak et al. 2002, Tyson and Piesman 2009).

3.2.2 Morfologie

Zástupci čeledi *Argasidae* nemají dorsální štít a tělní povrch je kožovitý. Sají po kratší dobu, ale opakovaně a proto žijí v blízkosti svých hostitelů – jsou tzv. nidikolní. Kromě více hostitelů mají také více nymfálních stádií (3-5) a celý vývoj trvá přibližně 2-3 roky. Samice kladou vajíčka vícekrát za život. Na lidech sající zástupci jsou druhy z rodů – *Argas*, *Ornithodoros*, *Otobius* (Tyson a Piesman 2009).

Klíšťata čeledi *Ixodidae* mají chitínový dorsální štít (scutum) a jejich životní cyklus zahrnuje tři hostitele. V Evropě je nejvíc zastoupené klíště *Ixodes ricinus*, které je významným vektorem mnoha zoonóz (klíšťová encefalitida, lymeská borelióza, tularemie, anaplazmóza, theilerióza a další). Do této čeledi patří také další lékařsky významní zástupci, jako jsou druhy z rodů: *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* (Tyson a Piesman 2009).

Vývojový cyklus klíštěte *Ixodes ricinus* má tři stadia - larvální stadium má tři páry nohou, zatímco nymfy a dospělci mají páry nohou čtyři. Každé stadium trvá přibližně rok, ale celková doba vývoje závisí na klimatických podmínkách, dostupnosti hostitelů atd. Celkově může být v rozpětí 2-6 let. V každém stadiu klíště saje jen jednou a většinou na jiném druhu hostitele. Larvální stadium saje zejména na hlodavcích a poté se vyvine v nymfu. Ta se živí na různých druzích malých a středních savců a vyvíjí se v dospělé, který se živí krví velkých savců. Páření většinou probíhá na hostiteli a významnou roli ve vyhledání partnera hrají feromony. Samice po posledním nasátí kladou více než tisíc vajíček, ze kterých se po vzestupu teploty na jaře líhnou larvy (Parola a Raoult 2001, Tyson a Piesman 2009).

Ústní ústrojí se skládá ze tří hlavních částí: chelicer, které slouží k narušení pokožky, sensorického orgánu (hmatové vlásky) důležitého při přichycení, hypostomu - část s velkým počtem zakřivených zubů, která slouží k sání. Klíšťata mají také periferní sensorické orgány, které jsou důležité při vyhledávání hostitele i ke komunikaci s ostatními klíšťaty. Hostitele vyhledávají podle chemických stimulantů (hladina CO₂), vzdušných vibrací a teploty (Parola a Raoult 2001, Tyson a Piesman 2009).

Klíšťata se po nalezení hostitele na něj přichytí a vyhledají vhodné místo k sání. Po plném nasátí klíšťata opouštějí hostitele, aby našla vhodné místo pro přeměnu na další vývojové stadium, nebo vstoupí do diapausy, ve které sníží metabolismus a pozdrží vývoj (Parola a Raoult 2001, Tyson a Piesman 2009). Při sání jsou vylučovány sliny, které mají oddálit nalezení a odstranění klíštěte, díky tomu, že obsahují látky, jako jsou: vasodilatátory, protizánětlivé látky, imunosupresiva a antikoagulanty. Tyto látky také mohou napomáhat přenosu patogenů (Zeidner et al. 1997).

Klíšťata čeledi *Ixodidae* jsou náchylná na vysychání, proto se vyskytují ve vlhkých, travnatých a zalesněných oblastech. Vykazují také sezónní aktivitu, která začíná aktivací klíštěte počátkem jara při vzrůstu teploty nad 5-8 °C a příznivou relativní vzdušnou vlhkostí (80-85 %). Při teplotách kolem 10 °C již probíhá metamorfóza a líhnutí vajíček. Klíšťata bývají v našich podmínkách aktivní přibližně od března-dubna až do listopadu. Co se týče nadmořských výšek, byl výskyt klíšťat ověřen až do 700-1200 m. n. m. (Lindgren a Jaenson 2006, Materna et al. 2008).

3.2.3 Metody detekce a identifikace genomových druhů

Pro detekci a identifikaci borélií se používají různé metody kultivační, mikroskopické, fenotypové a genotypové.

Kultivační metoda umožňuje, jak průkaz životaschopných borélií, tak získání dostatečného množství materiálu pro další analýzy. Borélie jsou kultivovány na různých modifikacích media BSK. Úspěšnost kultivace je bohužel poměrně nízká a závisí na mnoha faktorech (výběr a modifikace media, zdroj borélií, jejich množství a životaschopnost). Především složení media může významně ovlivnit růst borélií a jejich genovou expresi nebo virulenci a patogenitu. Při opakovaném pasážování může docházet i ke ztrátě plazmidů. Při koinfekci více druhů borélií, mohou rychleji rostoucí druhy přerůst ty pomalejší a tím zkreslit výsledky. Další nevýhodou je relativní časová náročnost metody (Wang et al. 2004, Gil et al. 2005).

Metody mikroskopické zahrnují pozorování borélií v temném poli, fluorescenční mikroskopii, případně barvení podle Giemsky a elektronovou mikroskopii. Tyto metody dávají přehled o přítomnosti a počtu (pozorování v temném poli, barvení) borélií, jejich tvaru

a struktury (elektronová, fluorescenční mikroskopie). Nevýhodou je, že na identifikaci genomových druhů je potřeba dalších analýz a v případě elektronové a fluorescenční mikroskopie jde o metody časově i finančně náročné (Aher et al. 2008, Manson a Harlow 2009, Nejedlá et al. 2009).

Mezi fenotypové metody patří zejména dříve používané SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfátová polyakrylamidová elektroforéza) a MLEE (multilokusová enzymová elektroforéza) (Wang et al 1999).

V současnosti jsou nejpoužívanější genotypové metody založené na polymerázové řetězové reakci a následné analýze amplifikovaných fragmentů. Pro identifikaci borélií se používají zejména RFLP (délkový polymorfismus restričních fragmentů) (Menardi et al. 2008), RLB (‘reverse line blotting’) (Gern et al. 2010) Relativní nevýhodou těchto metod může být, že neposkytují informaci o životaschopnosti borélií a detekují i stopová množství DNA. Pro detailnější analýzu variability *B. burgdorferi* s.l. se nejčastěji využívá multilokusové sekvenční analýzy (Margos et al. 2009). Kvantifikaci borélií ve vzorku umožňuje real-time PCR (Khanakah et al. 2006).

3.3. Cirkulace *B. burgdorferi* v přírodě

3.3.1 Hostitelé

Spektrum hostitelů klíšťat je velice široké a zahrnuje u dospělců: hmyzožravce (*Erinaceus roumanicus*), šelmy (*Vulpes vulpes*, *Martes martes*, *Meles meles*, *Felis silvestris*), sudokopytníky (*Sus scrofa*, *Cervus elaphus*, *Capreolus capreolus*, *Dama dama*, *Ovis musimon*), zajícovce (*Lepus europaeus*, *Oryctolagus cuniculus*), hlodavce (*Sciurus vulgaris*). Pro nymfy a larvy jsou hlavními hostiteli hmyzožravci (*Talpa europaea*, *Sorex minutus*, *S. araneus*, *Crocidura leucodon*), šelmy (*Vulpes vulpes*, *Martes martes*, *Mustela erminea*, *Felis silvestris*), sudokopytníci (*Sus scrofa*, *C. elaphus*, *C. capreolus*), zajícovci (*L. europaeus*), hlodavci (*Glis glis*, *Micromys minutus*, *Mus musculus*, *Apodemus flavicollis*, *Microtus arvalis*), z ptáků - bahňáci (*Scolopax rusticola*), měkkozobí (*Streptopelia decaocto*), šplhavci (*Dendrocopos major*), pěvci (*Alauda arvensis*, *Sturnus vulgaris*, *Sitta europaea*, *Fringilla coelebs*) (Nosek et al. 1967).

Různí hostitelé přenášejí borélie s různou úspěšností. Drobní savci (hmyzožravci, hlodavci) jsou kompetentními hostiteli borélií, zatímco velcí savci (*Capreolus capreolus*, *Alces alces*) jako významný zdroj infekce zřejmě nefungují (Tälleklint a Jaenson 1994). Mezi hlodavci hrají významnou roli *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *Microtus arvalis*, (Khanakah et al. 2006). K přenosu borélií může docházet i na nekompetentních hostitelích mechanismem tzv. 'co-feeding', kdy dochází k lokalizovanému přenosu mezi současně sajícími klíšťaty (Gern a Rais 1996, Randolph 2001, Humair et al. 2007). Při sání klíštěte hrají významnou roli sliny obsahující, kromě jiného, imunologicky aktivní látky, které zároveň napomáhají přenosu patogenů do hostitele. Mluvíme o tzv. 'saliva activated transmission' (Nuttall et al. 1994).

Spirochéty přežívají mezi jednotlivými vývojovými stadii klíštěte (transtadiální přenos) a také jsou, i když velmi zřídka, přenášeny ze samice na potomstvo (transovariální přenos). V těchto případech tedy vlastně funguje klíště zároveň jako vektor i rezervoár (Tilly et al. 2008) Nymfální stadium je z pohledu onemocnění lidí nejvýznamnější, protože nymfy sají na člověku nejčastěji (Hubálek et al. 2004).

Druhová diverzita v ekosystému má své důsledky i pro cirkulaci vektory přenášených onemocnění. Je-li druhová diverzita malá, a je-li zastoupen kompetentní hostitel, je také větší pravděpodobnost sání vektora na kompetentním hostiteli a tím větší riziko přenosu onemocnění. Naopak, když je druhová diverzita velká a rezervoárové zvíře je zastoupeno relativně méně, klesá také pravděpodobnost přenosu patogenů (diluční efekt) (Ostfeld a Keesing 2000).

3.3.2 *B. burgdorferi* v urbánních a periurbánních oblastech

Klíšťata, včetně těch infikovaných se nacházejí také v urbánních a periurbánních oblastech měst, kde představují zvýšené riziko přenosu onemocnění na člověka. Výskyt klíšťat v těchto oblastech má mozaikovitý charakter a realizace jejich životního cyklu závisí na přítomnosti vhodných hostitelů pro všechna vývojová stadia (Ostfeld a Keesing 2000, Pejchalová 2007).

Pro urbánní a periurbánní oblasti jsou typickými biotopy klíšťat zahrady, příměstské a městské lesoparky, louky. Nacházejí se zde listnaté (*Betula pendula*, *Quercus spp.*) a jehličnaté (*Pinus silvestris*) stromy, keře s bylinným a travnatým podrostem. Příznivá vlhkost a vyšší průměrné teploty v zimě napomáhají přežití většího množství vektorů. Typickými

hostiteli bývají malí (*Erinaceus europaeus*, *Apodemus flavicollis*, *Sciurus vulgaris*) a středně velcí obratlovci (*Vulpes vulpes*), v některých oblastech vysoká zvěř (*Capreolus capreolus*) a ptáci (*Turdus merula*). Oproti přírodním oblastem je zde relativně vysoká denzita klíšťat a mnohdy také vyšší prevalence původců onemocnění (*Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti* a *Borrelia burgdorferi* s.l.) (Stańczak et al 2004, Maetzel et al 2005, Pichon et al. 2006, Pejchalová et al. 2007, Žáková et al. 2007, Bradley a Altizer 2007, Silaghi et al. 2008).

V porovnání urbánních oblastí s evropským průměrem (10 % u nymf a 18 % u dospělců) dosahují prevalence většinou nižších hodnot u nymf (1,7 % - 17,3 %) a vyšších u dospělců (7,7 % - 33,3 %) (Bašta et al. 1999, Dautel a Kahl 1999, Stańczak et al. 2004, Rauter a Hartung 2005). Co se týče zastoupení jednotlivých druhů v pozitivních vzorcích, nejvíce se vyskytují *B. afzelii* a *B. garinii*, méně *B.b.* s.s. a nejméně *B. valaisiana* a *B. lusitaniae*. Také se vyskytují koinfekce více genomovými druhy - nejčastěji *B. afzelii* a *B. garinii*. Jsou zaznamenávány i koinfekce třemi druhy (Maetzel et al. 2005, Smetanová et al. 2007, Pejchalová et al. 2007).

4. Materiál a metody

4.1 Sběr vzorků

Vzorky klíšťat (nymfální a dospělá stadia *Ixodes ricinus*) byly získány metodou 'vlajkování', v každém sběru vždy 1 h a skladovány při -75 °C. Sběry byly prováděny Bc. Patrikem Kilianem v dubnu – srpnu 2009 v městském lesoparku Stromovka v Českých Budějovicích.

4.2 Detekce *Borrelia burgdorferi* s.l.

Příprava vzorků: Vzorky klíšťat byly zpracovány pomocí chelexové metody (Walsh et al. 1991, Rauter et al. 2002). V boxu s laminárním prouděním vzduchu (Telstar-Bioultra, třída II.) byla jednotlivá klíšťata rozdělena do sterilních homogenizačních zkumavek se 400 µl 10% suspenze Chelex® 100 Resin (BioRad Laboratories, USA) v pufru TE (10 ml 1 M Tris + 2 ml 0,5 M EDTA pH 8 do 1 l destilované vody) a ocelovou homogenizační kuličkou (průměr

5 mm). Homogenizace proběhla v homogenizátoru (TissueLyser II, Qiagen) 2 minuty při 30 Hz. Následně byly takto připravené vzorky inkubovány při 56 °C přes noc. Druhý den byly vzorky po 10 s vortexování inkubovány 10 minut při 98 °C a následně ihned zchlazeny na ledu. Po dalším 10 s vortexování byly vzorky centrifugovány a supernatant byl přenesen do nových sterilních 1,5 ml mikrozkuvek. Připravené vzorky byly uskladněny při -20 °C. Spolu se vzorky byla připravena i negativní kontrola neobsahující klíště.

Polymerázová řetězová reakce (PCR): DNA ve vzorcích byla použita jako templát pro PCR reakci s primery OspAOut1 a OspAOut2 (Generi-Biotech, ČR).

Finální koncentrace v reakční směsi: 1x koncentrovaný PPP master mix (Top-Bio, ČR) (75 mM Tris-HCl; pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween20; 2,5 mM MgCl₂; 200 μM dATP; 200 μM CTP; 200 μM DTP; 200 μM dTTP; 2,5 U Taq purple DNA polymerázy; stabilizátory a aditiva), primery OspAOut1 (GGGAATAGGTCTAATTTAGCC), OspAOut2 (CACTAATTGTTAAAGTGGAAGT) (0,4μM) (Priem et al. 1997).

Po 14,5 μl reakční směsi a 10,5 μl vzorku bylo napipetováno do 0,2 ml mikrozkuvek. Pro pozitivní kontrolu bylo k reakční směsi přidáno 1 μl DNA izolované z kultury *Borrelia burgdorferi* s.s. (kmen CB53) a objem byl doplněn 9,5 μl PCR H₂O.

Podmínky PCR: 1. Denaturace 5 min. při 95 °C

2. 30 cyklů 1. Denaturace 30 s při 94 °C

2. Nasedání primerů 30 s při 42 °C

3. Elongace 1 min. při 72 °C

3. Finální elongace 5 min. při 72 °C

4. Udržovací teplota 14 °C, dokud nebyly vzorky vyndány z cycleru

Separace elektroforézou v agarózovém gelu: K 10 μl PCR produktu byly přidány 2 μl nanášecího pufru (6x Orange DNA Loading Dye, Fermentas, Kanada) s 5x koncentrovaným barvivem SYBR Green (SYBR Green I, Nucleic acid stain, Ambresco, USA). Produkt byl rozdělen elektroforetickou separací v 1% agarózovém horizontálním gelu. Separace probíhala hodinu při 110 V. Produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru a fotograficky zdokumentovány. Ve vzorcích pozitivních na přítomnost *B. burgdorferi* byl detekován fragment o velikosti přibližně 665 pb.

4.3 Metody identifikace genomových druhů *B. burgdorferi* s.l.

Délkový polymorfismus restričních fragmentů (RFLP): Tato metoda byla prováděna podle Floris et al. (2007). Základem metody je restriční štěpení 'nested' PCR produktů získaných amplifikací části genu pro OspA pomocí restričních enzymů (endonukleázy, které rozpoznávají určitou cílovou sekvenci nukleotidů a v tomto místě DNA štěpí). Naštěpené fragmenty jsou následně rozděleny pomocí gelové elektroforézy. Na základě přítomnosti fragmentů o určitých velikostech jsou identifikovány genomové druhy borélií ve vzorcích.

Pozitivní vzorky (5 µl) byly použity jako templát pro 'nested' PCR s primery OspAIn1 (GCAAAATGTTAGCAGCCTTGAT), OspAIn2 (CTGTGTATTCAAGTCTGGTTC) (Priem et al. 1997). Podmínky PCR reakce byly stejné jako v případě PCR s primery OspAOut. Pomocí 'nested' PCR byl získán produkt o velikosti přibližně 392 pb.

Po 10 µl produktů 'nested' PCR bylo štěpeno restriktázou MseI (TruI) (Fermentas) (10 µl PCR produktu, 4 µl PCR H₂O, 1 µl Buffer R 10x, 0,5 µl MseI (Tru1)). Štěpení probíhalo 1 h při 65 °C a následně bylo zastaveno přidáním 0,6 µl 0,5 M EDTA.

Po přidání 4 µl nanášecího pufru (6x Orange DNA Loading Dye, Fermentas, Kanada) s 5x koncentrovaným barvivem SYBR Green (SYBR Green I, Nucleic acid stain, Ambresco, USA) byly vzorky separovány elektroforézou v 2% agarózovém gelu (2 g PCR agarózy ve 100 ml pufru 1x TAE) po 3,5 h při 80 V.

Na základě porovnání získaných restričních 'paternů' s publikovanými byly identifikovány genomové druhy *B. burgdorferi* s.l. Na základě štěpení enzymem MseI bylo možné identifikovat *B. garinii*, *B. afzelii*. a *B. spielmanii*.

Pro rozlišení *B. burgdorferi* s.s., *B. bissetti* a *B. valaisiana* byly produkty získané v 'nested' PCR štěpeny enzymem AlwI (BspPI) (Fermentas). Štěpení probíhalo stejně jako v případě MseI. Opět bylo štěpeno 10 µl produktů 'nested' PCR (10 µl PCR produktu, 4 µl PCR H₂O, 1 µl Buffer Tango 10x, 0,5 µl AlwI). Štěpení probíhalo 1 h při 55 °C, reakce byla zastavena teplotní inaktivací enzymu (80 °C, 20 min.), následně byly fragmenty separovány v 4 % agarózovém gelu 1 hodinu při 120 V.

Reverse line blotting: Tato metoda byla prováděna podle Morán-Cadenas et al. (2007). Základem metody je hybridizace značených PCR produktů se souborem specifických prob. Pomocí PCR je amplifikována část variabilního mezerníku mezi dvěma tandemovými

opakováními genů pro rRNA ribozomálních podjednotek 23S a 5S. PCR produkty jsou podrobeny hybridizaci s probami kovalentně vázanými na membránu. Jeden z primerů pro PCR je značen biotinem, což umožňuje následnou chemiluminiscenční detekci hybridizovaných produktů.

Pro RLB byla použita membrána Biodyne® C (Pall Corporation) aktivovaná v roztok 16% EDAC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) (Merck, SRN) 10 min. při laboratorní teplotě. Na ni byly v miniblotteru naneseny 5' amino značené proby naředěné na koncentraci 500 nM v roztoku 500 mM NaHCO₃ o pH 8,4 (0,84 g NaHCO₃ do 20 ml H₂O) (použité proby jsou uvedeny v Tab I).

Tab. I Proby použité pro identifikaci genomových druhů *B. burgdorferi* pomocí RLB

	<u>Cíl</u>	<u>Sekvence</u>	
SL	<i>B. b. s.l.</i>	5'- AMINO-CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA	Rijpkema et al. 1995
SS	<i>B. b. s.s.</i>	5'- AMINO-ACACCAATATTTAAAAACATAA	Rijpkema et al. 1995
GANE	<i>B. garinii</i>	5'- AMINO-CAAAAACATAAATATCTAAAAACATAA	Poupon et al. 2006
AF	<i>B. afzelii</i>	5'- AMINO-AACATTTAAAAAATAAATTCAAGG	Rijpkema et al. 1995
VS	<i>B. valaisiana</i>	5'- AMINO-CATTAAAAAATATAAAAAATAAATTCAAGG	Rijpkema et al. 1995
LUSINE	<i>B. lusitaniae</i>	5'- AMINO-TCAAGATTTGAAGTATAAAATAAAA	Poupon et al. 2006

Proby byly inkubovány 1 min. při laboratorní teplotě, následně byla membrána inaktivována ve 100 mM NaOH (0,4g NaOH do 100 ml H₂O) po 10 min. při laboratorní teplotě. Následným promytím v roztoku 2x SSPE/0,1 % SDS (89 ml H₂O, 10 ml 20x SSPE, 1 ml SDS 10 %) po 5 min. při 60 °C byla membrána připravena k použití.

Pomocí 'touch down' PCR s primery 23Sbor (TCAGGGTACTTAGATGGTTCCTT) a 5Sbor (značený biotinem) (biotin-GAGTTCGCGGGAGAGTAGGTTATT) byly připraveny značené PCR produkty. Složení PCR reakce bylo stejné jako v předchozích případech.

Podmínky 'touch down' PCR: I. ČÁST PROGRAMU (9 cyklů):

1. Počáteční denaturace 5 min. při 94 °C

2. Denaturace 20 s při 94 °C

3. Nasedání primerů (23S Bor, 5S Bor-biotin) 30 s při 60°C

4. Elongace 30 s při 72 °C

- v každém následujícím cyklu se teplota nasedání primerů snížila o 1 °C, dokud nedosáhla 52 °C.

II. ČÁST PROGRAMU (40 cyklů):

5. Denaturace 20 s při 94 °C

6. Nasedání primerů 30 s při 52 °C

7. Elongace 30 s při 72 °C

III. KONEČNÁ ELONGACE 7 min. při 72 °C

-udržování při 14 °C, dokud nebyly vzorky vyndány z cycleru

PCR produkty byly naředěny v roztoku 2x SSPE/0,1 % SDS (20 µl produktu + 180 µl roztoku 2x SSPE/0,1 % SDS) a denaturovány 10 min. při 99 °C. Denaturované vzorky byly ihned zchlazeny na ledu a membrána inkubována v 2x SSPE/0,1 % SDS 5 min. při laboratorní teplotě. Membrána byla uzavřena do blotteru tak, aby sondy byly kolmo na sloty blotteru a připravené vzorky byly nanесeny do slotů. Poté následovala hybridizace 60 min. při 42 °C. Následně byly vzorky ze slotů odsáty a membrána promývána 2x v roztoku 2x SSPE/0,5 % SDS (170 ml H₂O, 20 ml 20x SSPE, 10 ml SDS 10 %) po 10 min. při 52 °C. Následně byla membrána inkubována v roztoku konjugátu streptavidin-peroxidáza (2x SSPE/0,5 % SDS + 3 µl konjugátu) 30 min. při 42 °C. Nakonec byla membrána promývána 2x nejprve v roztoku 2x SSPE/0,5 % SDS 10 min. při 42 °C a poté 2x v roztoku 2x SSPE po 5 min. při laboratorní teplotě.

Hybridizovaná DNA byla na membráně detekována pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu (ECL detection kit, GE Healthcare) podle návodu výrobce. K připravené membráně byl v temné komoře přiložen citlivý film KODAK® (BioMax Light Film, Francie), který byl exponován po dobu 2 hodin. Film byl následně vyvolán standardním postupem.

Pro opakované použití byla membrána dehybridizována v roztoku 1 % SDS (180 ml H₂O, 20 ml SDS 10 %) po 1 h při 80 °C a promyta v roztoku 20 mM EDTA (4 ml 0,5M EDTA, pH 8 do 100 ml H₂O) o pH 8 po 15 min. při laboratorní teplotě. Pro dlouhodobé skladování byla membrána uložena v plastovém sáčku při 4 °C.

5. Výsledky

5.1 Populační aktivita *I. ricinus*

Klíšťata byla sbírána na jaře a v průběhu léta 2009 (duben – srpen), aktivita klíštěcích populací byla vyjádřena jako počet jedinců na hodinu sběru. U nymf je zaznamenána maximální aktivita hned v dubnu a u dospělců až v červnu. Celkově aktivita nymf několikanásobně převyšovala aktivitu dospělců ve všech sběrech (Tab. II, Obr. 1).

Tab. II Populační aktivita klíšťat

měsíc	aktivita dospělci*	aktivita nymfy*
duben	2	84
květen	2	59
červen	26	79
červenec	3	58
srpen	6	50
průměrně na 1 měsíc	7,80	66,00

* počet jedinců na 1 hodinu sběru



Obr. 1 Populační aktivita klíšťat v průběhu sezóny

5.2 Prevalence *B. burgdorferi* s.l.

Na přítomnost DNA *B. burgdorferi* s.l. bylo celkem vyšetřeno 369 klíšťat (330 nymf, 14 samic a 25 samců), která pocházela z městského lesoparku Stromovka (viz Obr. 2). Všechna klíšťata byla testována na přítomnost borélií pomocí PCR, u pozitivních vzorků byla následně provedena konfirmace pomocí RLB.

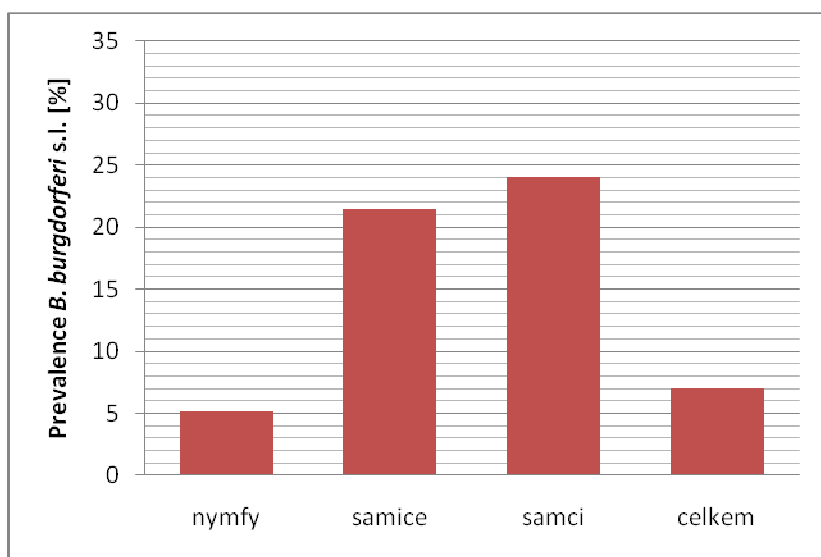


Obr. 2 Příklad výsledku detekce borélií v klíšťatech pomocí PCR

Celková prevalence *B. burgdorferi* s.l. dosáhla 7,1 % (26 pozitivních z 369 vyšetřených). Prevalence u nymf (5,2 %) byla výrazně nižší než u dospělců (23,1 %) zatímco rozdíl v prevalenci mezi pohlavími dospělých klíšťat výrazný nebyl (Tab. III, Obr. 3).

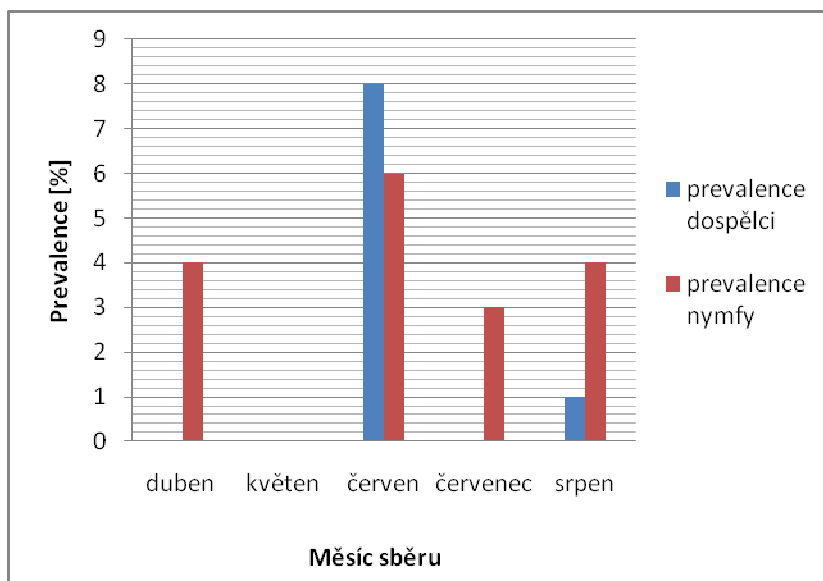
Tab. III Prevalence *B.burgdorferi* s.l.

	nymfy	samice	samci	dospělci celkem
vyšetřených	330	14	25	39
pozitivních	17	3	6	9
prevalence[%]	5,2	21,4	24	23,1



Obr. 3 Porovnání prevalence *B. burgdorferi* s.l. v jednotlivých stádiích klíšťat

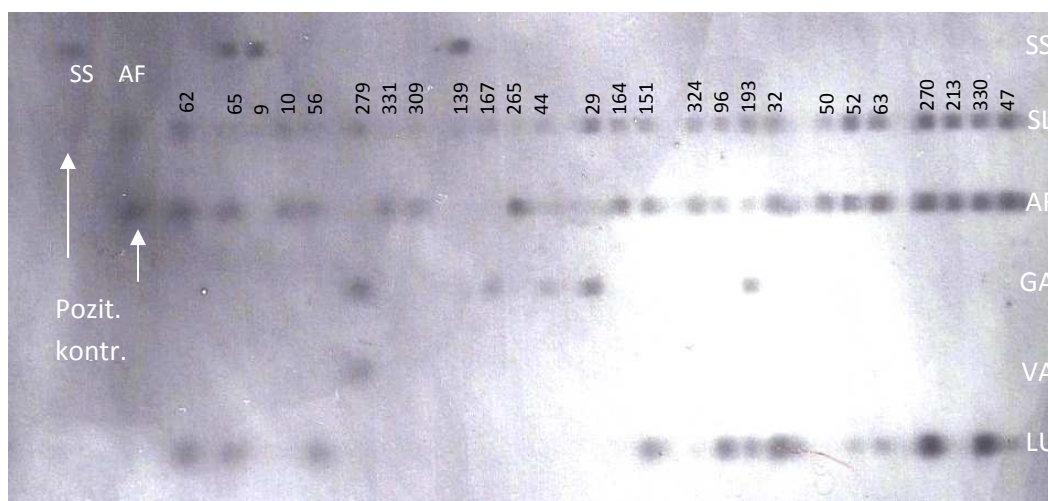
V průběhu sezóny byla nejvyšší prevalence zjištěna v červnových sběrech a nejnižší naopak ve sběrech květnových (Obr. 4).



Obr. 4 Prevalence borélií v průběhu sezóny

5.3 Identifikace genomových druhů *B. burgdorferi* s.l.

Pomocí metody RLB bylo identifikováno všech 26 vzorků, pozitivní vzorky hybridizovaly a probou pro detekci *B.b.* s.l.

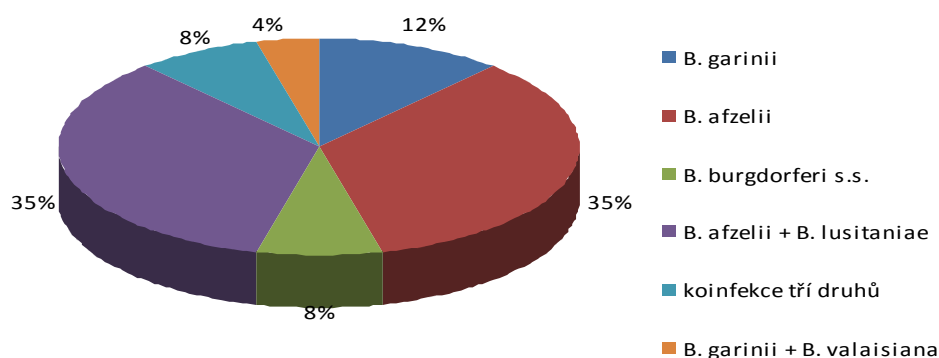


SS - *B. burgdorferi* s.s., SL - *B. burgdorferi* s.l., AF - *B. afzelii*, GA - *B. garinii*, VA - *B. valaisiana*, LU - *B. lusitaniae*.

Obr. 5 Výsledky RLB na filmu

Pomocí metody RLB bylo zjištěno, že mezi 26 pozitivními vzorky byla nejčastěji zastoupena *B. afzelii* (n=9), méně pak *B. garinii* (3) a *B. burgdorferi* s.s. (2). Koinfekce byla nejčastěji dvěma genomovými druhy *B. afzelii* a *B. lusitaniae* (9), v jednom případě koinfekce *B. garinii* a *B. valaisiana* a ve dvou případech šlo o koinfekci tří druhů *B. afzelii*, *B. garinii* (*B.b. s.s* ve druhém případě) a *B. lusitaniae* (viz. Obr. 6).

Zastoupení genomových druhů dle RLB



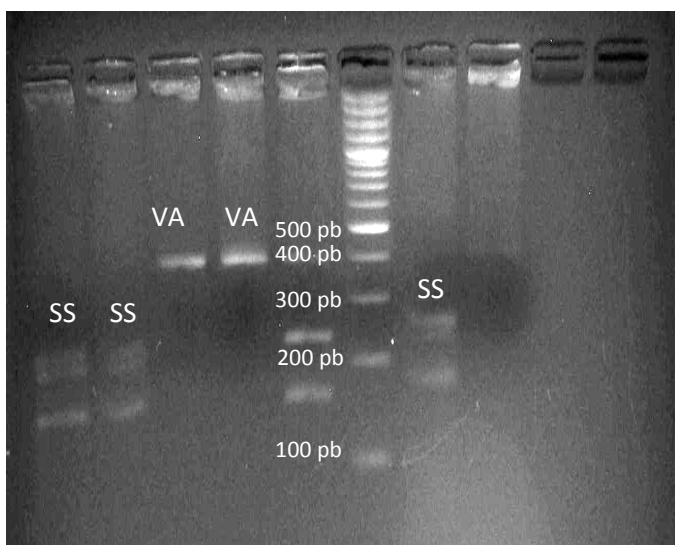
Obr. 6 Zastoupení genomových druhů *B. burgdorferi* s.l. (metoda RLB)

Celkově byla nejvíce zastoupena *B. afzelii* (20; 77 %), méně pak *B. lusitaniae* (11; 42 %) a *B. garinii* (5; 19 %) a nejméně *B. burgdorferi* s.s. (3;12 %) a *B. valaisiana* (1; 4 %).

Pomocí metody RFLP bylo identifikováno všech 26 vzorků, příklady restričního štěpení (MseI, AlwI) jsou znázorněny na Obr. 7 a 8.



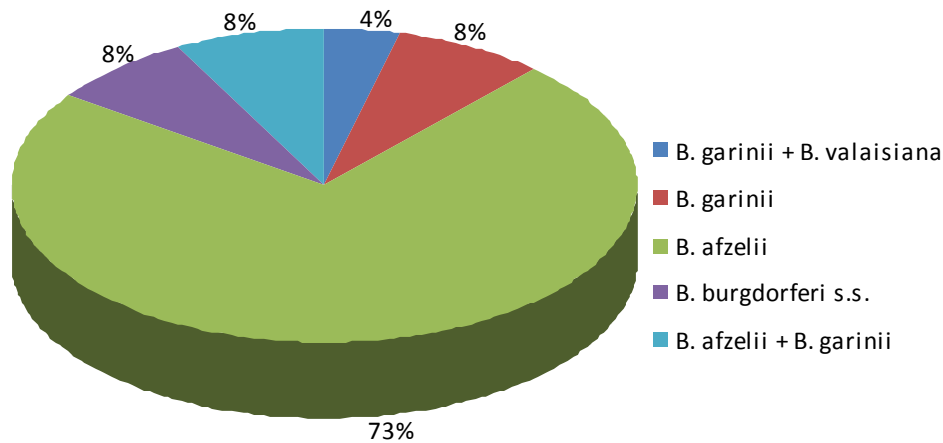
Obr. 7 Výsledky RFLP na gelu (MseI)



Obr. 8 Výsledky RFLP na gelu (AlwI)

Podle výsledků získaných pomocí metody RFLP byla nejvíce zastoupena *B. afzelii* (n=19), méně koinfence *B. garinii* a *B. afzelii* (2) a nejméně *B. burgdorferi* s.s. (2). Ve dvou případech byla zastoupena *B. garinii* a v jednom případě koinfekce *B. garinii* a *B. valaisiana* (viz Obr. 9).

Zastoupení genomových druhů dle RFLP



Obr. 9 Zastoupení genomových druhů *B. burgdorferi* s.l. (metoda RFLP)

Celkově byla nejvíce zastoupena *B. afzelii* (21; 81 %), méně pak *B. garinii* (5; 19 %) a nejméně *B. burgdorferi* s.s. (2; 8 %) a *B. valaisiana* (1; 4 %).

Obě metody identifikace byly porovnány. Výsledek identifikace se zcela shodoval u 14 pozitivních vzorků. U 10 případů se sice metody rozcházely, ale pouze v detekci koinfekce *B. afzelii* a *B. lusitaniae* (pomocí RFLP nebylo možné odlišit *B. lusitaniae* od *B. afzelii*), v 1 případě nebyla pomocí RLB detekována koinfekce *B. afzelii*, a v 1 případě RFLP neodhalila koinfekci tří druhů. Celkově tedy bylo shodně identifikováno 24 z 26 vzorků (bez *B. lusitaniae*). Porovnání identifikace genomových druhů s pomocí obou metod je znázorněno v Tab. IV.

Tab. IV Porovnání metod RLB a RFLP při určení genomových druhů

vzorek	RFLP	RLB	Vzorek	RFLP	RLB
9	<i>B. af</i>	<i>B. af</i>	139	<i>B. af+B. ga</i>	<i>B. ga</i>
10	<i>B.b. s.s.</i>	<i>B.b. s.s.</i>	151	<i>B. ga</i>	<i>B. ga</i>
29	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu</i>	164	<i>B. af</i>	<i>B. af</i>
32	<i>B. af</i>	<i>B. af</i>	167	<i>B. af</i>	<i>B. af</i>
44	<i>B.b. s.s.</i>	<i>B.b. s.s.</i>	193	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu</i>
47	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu</i>	213	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu</i>
50	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu</i>	265	<i>B. ga</i>	<i>B. ga</i>
52	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu</i>	270	<i>B. af</i>	<i>B. af</i>
56	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu+B. s.s.</i>	279	<i>B. af</i>	<i>B. af</i>
62	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu</i>	309	<i>B. ga+B. va</i>	<i>B. ga+B. va</i>
63	<i>B. af</i>	<i>B. af</i>	324	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu</i>
65	<i>B. af</i>	<i>B. af+B. lu</i>	330	<i>B. af</i>	<i>B. af</i>
96	<i>B. af+B. ga</i>	<i>B. af+B. ga+B. lu</i>	331	<i>B. af</i>	<i>B. af</i>

B. af – *B. afzelii*, *B. ga* - *B. garinii*, *B.b. s.s.* - *B. burgdorferi s.s.*, *B. lu* - *B. lusitaniae*,
B. va - *B. valaisiana*.

6. Diskuze

Klíšťaty přenášená onemocnění patří mezi závažná zdravotní rizika. Pravděpodobnost nákazy odpovídá míře kontaktu s patogenním agens. V případě lymeské boreliózy tedy s infikovaným vektorem (Randolph 2001). Lymeská borelióza je typicky přírodně ohniskovou nákazou, ale klíšťata i jimi přenášené patogeny se mohou vyskytovat i v méně obvyklých periurbánních či urbánních habitatech, kde riziko vzhledem k častému kontaktu s člověkem roste (Bradley a Altizer 2007). Cílem této bakalářské práce bylo prokázat výskyt klíšťat a *Borrelia burgdorferi* s.l. v městském lesoparku Stromovka v Českých Budějovicích a stanovit zastoupení genomových druhů borélií.

Aktivita klíšťat se v průběhu sezóny měnila. U nymf byl první vrchol již v dubnu a druhý v červnu, u dospělců se objevil jen jeden vrchol v červnu. Kolísání aktivity je zřejmě dáno zejména klimatickými podmínkami a také přirozeným cyklem *I. ricinus*. Obecně jsou popisovány dva vrcholy aktivity klíšťat - jeden na jaře a druhý menší na podzim. Ovšem je znám i jednovrcholový průběh s jediným maximem na jaře (např. Hubálek a kol. 1994). Vyšší aktivita nymf než dospělců je dána zejména přirozenou mortalitou jednotlivých stádií klíšťat, určitou roli by případně mohl hrát i nedostatek vhodných hostitelů pro nymfální stádia, který by zabraňoval metamorfóze nymf na dospělé.

Hodnoty prevalence *B. burgdorferi* v klíšťatech ze Stromovky (u dospělců 23 %, u nymf 5 %) jsou v porovnání s evropským průměrem u nymf nižší, ale u dospělců naopak vyšší. Hubálek a Halouzka (1998) uvádějí průměrnou prevalenci 11 % pro nymfy a 17 % pro dospělé, Rauter a Hartung (2005) pak 10 % u nymf a u dospělců 18 %. Hlavním faktorem, který ovlivňuje prevalenci borelií je zřejmě zastoupení nekompetentních hostitelů (Tälleklint a Jaenson 1994, Tälleklint-Eisen a Eisen 1999, Randolph 2001).

Zjištěná prevalence je srovnatelná s hodnotami získanými ve studiích jiných urbánních oblastí: Dautel a Kahl (1999) (8 % u nymf a 20 % u dospělců) a Stańczak et al. (2004) (7 % u nymf a 20 % u dospělců). V rámci prací zaměřených na urbánní oblasti lze najít i oblasti s výrazně vyšší prevalencí u dospělců. Například ve studii Pejchalové et al. (2007) dosáhla prevalence v dospělcích 29 %.

Prevalence *B. burgdorferi* s.l. u dospělců (23 %) několikanásobně převýšila prevalenci u nymf (5 %). Rozdíl v prevalenci patogenů mezi jednotlivými stádii *I. ricinus* je obvyklý

(Hubálek a Halouzka 1998, Rauter a Hartung 2005). Vysvětlením může být, že dospělci sají jako larvy i jako nymfy a pravděpodobnost nákazy je tedy oproti nenasátým nymfám dvojnásobná (kumulační efekt v průběhu života je způsoben transstadiálním přenosem spirochét). Svou roli může sehrát i to, že různá vývojová stadia klíšťat preferují různé hostitele, kteří mohou mít různou kompetenci k přenosu *B.b.* (Matuschka et al. 1991, Bradley a Altizer 2007). Zároveň byly počty dospělců testovaných na přítomnost borélií poměrně nízké, takže by se mohlo jednat i o statistickou chybu.

Metoda RLB je v současnosti nejpoužívanější metodou pro identifikaci genomových druhů *B. burgdorferi* s.l. (Rijpkema et al. 1995, Maetzel et al. 2005, Pichon et al. 2006, Poupon et al. 2006, Morán-Cadenas et al. 2007). Výhodou této metody je její vyšší citlivost oproti vizualizaci elektroforeticky separovaných fragmentů na gelu, možnost zpracování velkého množství vzorků a jednoduchá interpretace koinfekcí. Nevýhodou do nedávné doby bylo, že zatím nebyly nalezeny vhodné proby pro identifikaci *B. spielmanii* a *B. bissettii*. Další nevýhodou je zkřížená hybridizace některých vzorků – týká se zejména vzorků *B. afzelii*, které mohou poskytovat i slabý signál s probou pro *B. lusitaniae*. V nedávné době byl publikován doplněný protokol obsahující proby pro *B. bissettii*, *B. spielmanii* i 'relapsing fever-like' borélie (spirochéty podobné boréliím návratných horeček (Gern et al. 2010)). Tento protokol tedy pokrývá celé spektrum borélií, které byly dosud v Evropě v klíšťatech detekovány částečně i řeší výše zmíněnou nespecifickou hybridizaci.

Metoda RFLP byla použita zejména jako doplnění RLB pro identifikaci *B. spielmanii* a *B. bissettii*. Uvedený protokol ovšem naopak není schopen odlišit *B. lusitaniae*. V případě RFLP je interpretace koinfekcí, kdy jsou získány smíšené 'paterny' náročnější a vzhledem k štěpení produktu může dojít i k tomu, že méně zastoupený genomový druh nebude na gelu detekován.

Celkově bylo oběma metodami identifikováno souhlasně 24 vzorků z 26 (92 %). V obou případech nesouhlasných výsledků nebyla jednou z metod zachycena koinfekce druhým genomovým druhem (*B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii*). V případě nezachycení koinfekce u RFLP byla příčinou pravděpodobně nižší citlivost metody. V druhém případě nebyla zachycena koinfekce *B. afzelii* metodou RLB. Vysvětlením by mohla být mutace v intergenovém mezerníku *B. afzelii*, který pak v RLB nehybridizoval s příslušnou probou.

Obě metody shodně uvádějí, že největší zastoupení má *B. afzelii*, následně *B. garinii*, pak *B.b. s.s.* a nejméně *B. valaisiana* (stejně jako studie Maetzel 2005). V koinfekcích je nejpočetnější *B. afzelii* a *B. garinii* podle RFLP (podobně jako Pejchalová et al. 2007) a podle RLB koinfekce *B. afzelii* a *B. lusitaniae*. Koinfekce *B. garinii* a *B. valaisiana* byla shodně odhalena pomocí obou metod. Koinfekce tří druhů byla detekována pouze pomocí RLB. Koinfekce se objevily ve stejné míře u dospělců jako u nymf. U dospělců lze koinfekce dvěma genomovými druhy borélií vysvětlit transtadiálním přenosem spirochét. U nymf může být příčinou přerušené sání na jednom hostiteli a dokončení sání na hostiteli jiném, infikovaném jiným genomickým druhem borélie (Piesman et al. 1991). Druhou možností je simultánní infekce hostitele dvěma druhy borélií (Khanakah et al. 2006).

Zastoupení jednotlivých druhů se od evropského průměru (Hubálek a Halouzka 1997, Rauter a Hartung 2005) - *B. afzelii* 37,1 %, respektive 38 %, *B. garinii* 39,7 %, resp. 33 %, pak *B.b. s.s.* 15,9 %, resp. 18 %, *B. valaisiana* 6,7 %, resp. 19% a *B. lusitaniae* 0,6 % resp. 7 % liší zejména nižším zastoupením *B. garinii* a vysokým zastoupením *B. afzelii* (77 %) a *B. lusitaniae* (42 %). Odlišné zastoupení genomových druhů je pravděpodobně zapříčiněno odlišným složením hostitelské fauny. Vysoké zastoupení *B. afzelii* odpovídá velkému zastoupení drobných hlodavců, což by kompetentních hostitelů tohoto druhu. *B. lusitaniae* je naopak spojována s plazy (Kurtenbach et al. 2001, Margos et al. 2009). V případě *B. lusitaniae* se jednalo vždy o koinfekci s *B. afzelii*, je proto možné, že se jednalo o zkříženou reakci mezi probami (jak bylo popsáno Gern et al. (2010)). Přítomnost *B. afzelii* v těchto vzorcích byla potvrzena pomocí RFLP. Z pohledu hostitelské spacity genomových druhů *B. burgdorferi* je poměrně překvapivé malé zastoupení *B. garinii* jakožto genomového druhu spojovaného s ptáky. V dalším pokračování práce plánujeme zapojení molekulárních metod identifikace hostitelů klíšťat, které by měli blíže osvětlit vztahy mezi hostiteli, klíšťaty a boréliemi v rámci tohoto biotopu.

7. Závěr

V rámci práce byl potvrzen výskyt klíšťat a spirochét lymeské boreliózy v městském lesoparku Stromovka v Českých Budějovicích. Prevalence borélií v případě nymf dosahovala nižších hodnot než je evropský průměr, v případě dospělců však hodnot srovnatelných. Tato lokalita je vzhledem k značnému využití k rekreačním účelům epidemiologicky významná.

Seznam použité literatury:

Aher A.R., Shah H., Rastogi V., Tukaram P.K., Choudhury R.C. 2008. A case report of relapsing fever. *Indian. J. Pathol. Microbiol.* **51**:292-293.

Bašta J., Plch J., Hulínská D., Daniel M. 1999. Incidence of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks in an urban environment, Prague, Czech Republic, between 1995 and 1998. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:515-517.

Battisti J.M., Bono J.L., Rosa P.A., Schrupf M.E., Schwan T.G., Policastro P.F. 2008. Outer surface protein A protects Lyme disease spirochetes from acquired host immunity in the tick vector. *Infect Immun.* **76**:5228-5237.

Bradley C.A., Altizer S. 2007. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends. Ecol. Evol.* **22**:95-102.

Bratton R.L., Whiteside J.W., Hovan M.J., Engle R.L., Edwards F.D. 2008. Diagnosis and treatment of Lyme disease. *Mayo Clin. Proc.* **83**:566-571.

Buczek A., Rudek A., Bartosik K., Szymanska J., Wojcik-Fatla A. 2009. Seroepidemiological study of *Lyme borreliosis* among forestry workers in southern Poland. *Ann Agric Environ Med.* **16**:257-261.

Dautel, H. a O. Kahl. 1999. Ticks (*acari: ixodoidea*) and their medical importance in the urban environment. V: *Robinson W.H., Rettich F., Rambo G.W. (ed.): Proceeding of the 3rd international conference on urban pests. Prague, str. 73-82.*

Delihias N. 2009. Intergenic regions of *Borrelia* plasmids contain phylogenetically conserved RNA secondary structure motifs. *BMC Genomics.* **10**:101.

Elias A., Bono J.L., Tilly K., Rosa P. 1998. Growth of infectious and non-infectious *B. Burgdorferi* at different salt concentrations. *Wien Klin Wochenschr.* **110**:863-865.

Floris R., Menardi G., Bressan R., Trevisan G., Ortezio S., Rorai E., Cinco M. 2007. Evaluation of a genotyping method based on the *ospA* gene to detect *Borrelia burgdorferi* sensu lato in multiple samples of Lyme borreliosis patients. *New Microbiol.* **30**: 399-410.

- Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M., Sutton G.G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E.K., Gwinn M., Dougherty B., Tmob J.-F., Fleischmann R.D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A.R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M.D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fujii C., Cotton M.D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H.O., Venter J.C. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. **390**:580-686.
- Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes release 5.0 Bergey's Manual[®] of systematic bacteriology second edition. *Bergey's manual trust*.
- Gern L. a Rais O. 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* **33**:189-192.
- Gern, L., Douet V., López Z., Rais O., Morán Cadenas F. 2010. Diversity of *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. *Ticks Tick Borne Dis.* **1**:23-29.
- Gil H., Barral M., Escudero R., García-Peréz A.L., Anda P. 2005. Identification of a new *Borrelia* species among small mammals in area of northern Spain where Lyme disease is endemic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1336-1345.
- Gilbert M.A., Morton E.A., Bundle S.F., Samuels D.S. 2007. Artificial regulation of ospC expression in *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **63**:1259-1273.
- Hildenbrand P., Craven D.E., Jones R., Nemeskal P. 2009. Lyme neuroborreliosis: manifestations of a rapidly emerging zoonosis. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **30**:1079-1087.
- Horak I.G., Camicas J.L., Keirans J.E. 2002. The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari:Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp. App. Acarol.* **28**:27-54.
- Hovius J.W., Schuijt T.J., de Groot K.A., Roelofs J.J., Oei G.A., Marquart J.A., de Beer R., van't Veer C., van der Poll T., Ramamoorthi N., Fikrig E., van Dam A.P. 2008. Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *J. Infect. Dis.* **198**:1189-1197.
- Hovius J.W., van Dam A.P., Fikrig E. 2007. Tick-host-pathogen interactions in *Lyme borreliosis*. *Trends Parasitol.* **23**:434-438.
- Hubálek Z., Halouzka J. 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.* **13**:951-957.
- Hubálek Z., Halouzka J. 1998. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol. Res.* **84**:167-172.
- Hubálek Z., Halouzka J., Juřicová Z., Svobodová Š. 1994. Seasonal distribution of borreliae in *Ixodes ricinus* ticks. *Zbl. Bakt.* **280**:423-431.
- Hubálek Z., Halouzka J., Juřicová Z. 2004. Borreliae in *Ixodes ricinus* ticks feeding on humans. *Med. Vet. Entomol.* **18**:228-231.
- Humair P.-F., Douet V., Morán-Cadenas F., Schouls L.M., van De Pol I., Gern L. 2007. Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J. Med. Entomol.* **44**:869-880.

- Charon N.W., Goldstein S.F., Marko M., Hsieh C., Gebhardt L.L., Motaleb M.A., Wolgemuth C.W., Limberger R.J., Rowe N. 2009.** The flat-ribbon configuration of the periplasmic flagella of *Borrelia burgdorferi* and its relationship to motility and morphology. *J. Bacteriol.* **191**:600-607.
- Kahl O., Janetzki-Mittmann C., Gray J.S., Jonas R., Stein J., de Boer R. 1998.** Risk of infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zbl. Bakt.* **287**:41-52.
- Khanakah G., Kocianová E., Vyrostecková V., Řeháček J., Kundi M., Stanek G. 2006.** Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi sensu lato* i rodents from north eastern Austria. *Wiener Klin. Wochenschr.* **118**:754-758.
- Kurtebach K., De Michelis S., Sewell H-S., Etti S., Schäfer S.M., Hails R., Collares-Pereira M., Santos-Reis M., Hanincová K., Labuda M., Bormane A., Donaghy M. 2001.** Distinct combination of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4926-4929.
- Lin T., Gao L., Edmondson D.G., Jacobs M.B., Philipp M.T., Norris S.J. 2009.** Central role of the Holliday junction helicase RuvAB in vlsE recombination and infectivity of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS Pathog.* **5**:e1000679.
- Lindgren E., Jaenson T.G.T. 2006.** Lyme borreliosis in Europe: Influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. *World Health Organization*. ISBN 92-890-2291-4.
- Liu J., Lin T., Botkin D.J., McCrum E., Winkler H., Norris S.J. 2009.** Intact flagellar motor of *Borrelia burgdorferi* revealed by Cryo-electron tomography: evidence for stator ring curvature and rotor/C-ring assembly flexion. *J. Bacteriol.* **191**:5026-5036.
- Maetzel D., Maier W.A., Kampen H. 2005.** *Borrelia burgdorferi* infection prevalences in questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. *Parasitol. Res.* **95**:5-12.
- Manson M.D., Harlow M.L. 2009.** A grand view of the flagellar motor. *J. Bacteriol.* **191**:5023-5025.
- Margos G., Vollmer S.A., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K. 2009.** A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:5410-5416.
- Maruskova M., Esteve-Gassent M.D., Sexton V.L., Seshu J. 2008.** Role of the BBA64 locus of *Borrelia burgdorferi* in early stages of infectivity in a murine model of Lyme disease. *Infect. Immun.* **76**:391-402.
- Materna J., Daniel M., Metelka L., Harčarik J. 2008.** The vertical distribution, density and the development of the tick *Ixodes ricinus* in mountain areas influenced by climate changes (The Krkonoše Mts., Czech Republic). *Int. J. Med. Microbiol.* **289**:25-37.
- Matuschka F.R., Fischer P., Musgrave K., Richter D., Spielman A. 1991.** Hosts on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **44**:100-7.
- Menardi G., Floris R., Mignozzi K., Boemo B., Altobelli A., Cinco M. 2008.** Detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* in the trans-border area between Italy and Slovenia and evaluation of co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in ticks. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**:121-124.

- Morán-Cadenas F., Schneider H., Lommano E., Burri C., Moret J., Gern L. 2007.** A comparison of two DNA extraction approaches in the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from live *Ixodes ricinus* ticks by PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**:555-561.
- Myers T.A., Kaushal D., Philipp M.T. 2009.** Microglia are mediators of *Borrelia burgdorferi*-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells. *PLoS Pathog.* **5**:e1000659.
- Nau R., Christen H.J., Eiffert H. 2009.** Lyme disease—current state of knowledge. *Dtsch Arztebl Int.* **106**:72-81.
- Neelakanta G., Li X., Pal U., Liu X., Beck D.S., DePonte K., Fish D. Kantor F.S. Fikrig E. 2007.** Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PLoS Pathog.* **3**:e33.
- Nejedlá P., Norek A., Vostal K., Žáková A. 2009.** What is the percentage of pathogenic borreliae in spirochaetal findings of mosquito larvae. *Ann. Agric. Environ. Med.* **16**:273-276.
- Nosek J., Lichard M., Sztankay M. 1967.** The ecology of ticks in Tribeč and Hronský Inovec mountains. *Bull. Org. Mond. Santé. Bull. Wld. Hlth. Org.* **36**:49-59.
- Nuttall P.A., Jones L.D., Labuda M., Kaufman W.R. 1994.** Adaptations of arboviruses to ticks. *J. Med. Entomol.* **31**:1-9.
- Ostfeld R.S., Keesing F. 2000.** The fiction of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can. J. Zool.* **78**:2061-2078.
- Parola P., Raoult D. 2001.** Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* **32**:897-928.
- Pejchalová K., Žáková A., Mejzlíková M., Halouzka J., Dendis M. 2007.** Isolation, cultivation and identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies from *Ixodes ricinus* tick from the city of Brno, Czech Republic. *Ann. Agric. Environ. Med.* **14**:75-79.
- Piesman J. 1991.** Experimental acquisition of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) during partial blood meals. *J. Med. Entomol.* **28**:259-262.
- Pichon B., Kahl O., Hammer B., Gray J.S. 2006.** Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **6**:382-387.
- Postic D., Garnier M. Baraton G. 2007.** Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – Description of *B. californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**:263-271.
- Poupon M-A., Lommano E., Humair P-F., Douet V., Rais O., Schaad M., Jenni L., Gern L. 2006.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:976-979.
- Priem S., Rittig M.G., Kamradt T., Burmester G.R., Krause A. 1997.** An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **35**:685–690.
- Randolph S.E. 2001.** The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **356**:1045-1056.
- Rauter C., Hartung T. 2005.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* Tick in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7203-7216.

- Rauter C., Oehme R., Diterich I., Engele M., Hartung T. 2002.** Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by novel, single-run, real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:36-43.
- Revel A.T., Talaat A.M., Norgard M.V. 2002.** DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**:1562-1567.
- Rijpkema S.G., Molkenboer M.J., Schouls L.M., Jongejan F., Schellekens J.F. 1995.** Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3091-3095.
- Rudenko N., Golovchenko M., Němec J., Volkaert J., Mallátová N., Grubhoffer L. 2005.** Improved method of detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples by polymerase chain reaction without DNA purification. *Folia Microbiol.* **50**:31-39.
- Rudenko N., Golovchenko M., Růžek D., Piskunova N., Mallátová N., Grubhoffer L. 2009.** Molecular detection of *Borrelia bissetti* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **292**:274-281.
- Sal M.S., Li C., Motalab M.A., Shibata S., Aizawa S., Charon N.W. 2008.** *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure. *J. Bacteriol.* **190**:1912-1921.
- Shi Y., Xu Q., Seemanapli S.V., McShan K., Liang F.T. 2008.** Common and unique contributions of decorin-binding proteins A and B to the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One.* **3**:e3340.
- Silaghi C., Gilles J., Höhle M., Fingerle V., Just F.T., Pfister K., 2008.** *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:972-974.
- Smetanová K., Burri C., Pérez D., Gern L., Kocianová E. 2007.** Detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in tick from three different regions in Slovakia. *Wien Klin Wochenschr.* **119**:534-537.
- Stańczak J., Gabre R.M., Kruminis-Lozowska W., Racewicz M., Kubica-Biernat B. 2004.** *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma Phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**:109-114.
- Steere A.C., Coburn J., Glickstein L. 2004.** The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* **113**:1093-1101.
- Tälleklint L., Jaenson T.G. 1994.** Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. *J. Med. Entomol.* **31**:880-886.
- Tälleklint-Eisen L. a Eisen R.J. 1999.** Abundance of ticks (Acari: Ixodidae) infesting the western fence lizard, *Sceloporus occidentalis*, in relation to environmental factors. *Exp. Appl. Acarol.* **23**:731-740.
- Tilly K., Rosa P.A., Stewart P.E. 2008.** Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **22**:217-234.
- Tyson K.R., Piesman J. 2009.** Lyme disease spirochete-tick-host interactions. *Adv. Insect. Phys.* **37**:243-296.

Walsh, P. S., Metzger D. A., Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. **10**:506–513.

Wang G., Iyer R., Bittker S., Cooper D., Small J., Wormser G.P., Schwartz I. 2004. Variations in Barbour-Stoenner-Kelly culture medium modulate infectivity and pathogenicity of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates. *Infect. Immun.* **72**:6702-6706.

Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:633-653.

Zeidner N., Mbow M.L., Dolan M., Massung R., Baca E., Piesman J. 1997. Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: induction of a TH2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect. Immun.* **65**:3100-3106.

Žáková A., Netušil J., Martiníková H. 2007. Influence of environmental factors on the occurrence of *Ixodes ricinus* in the urban locality of Brno – Pisárky, Czech republic. *J. Vector Ecol.* **32**:29-33.